

产品成分

Protein A是一种金黄色葡萄球菌的细胞壁蛋白，可以结合哺乳动物免疫球蛋白部份亚型的Fc区，本产品是偶联有重组Protein A的琼脂糖磁性微球，具有高结合力，高载量的特点，可应用于免疫沉淀/免疫共沉淀实验以及抗体的纯化。具体性能如下表：

指标	性能
基质	磁性琼脂糖微球
配体	重组蛋白A
载量	>40 mg 人IgG/mL微球（固体体积）
粒径（um）	20-99
pH稳定范围	3-10
储存缓冲液	含20%乙醇的1×PBS
储存温度	2℃-8℃

包装规格

1 mL/5 mL

保存条件

Beads保存在含20%乙醇的PBS中，2℃-8℃保存，有效期2年。不可低于0℃保存。

使用方法

使用本产品前，先确认一抗种属和亚型，参考下表确认本产品与之兼容。如不确定亚型或出于兼容考虑，可以考虑Protein A/G Magarose beads，其结合能力参考下表。

种 属	亚 型	Protein A	Protein G	Protein A/G
Human	IgA	variable	—	++
	IgD	—	—	—
	IgE	—	—	—
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	—	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgM	variable	—	++
Avian egg yolk	IgY	—	—	—
Cow		++	++++	++++
Dog		++	+	++++
Goat		—	++	++++
Guinea pig	IgG1	++++	++	++++
	IgG2	++++	++	++++
Hamster		+	++	—
Horse		++	++++	++++
Koala		—	+	—
Llama		—	+	—
Monkey (rhesus)		++++	++++	++++
Mouse	IgG1	+	++++	++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	+++
	IgG3	++	+++	+++
	IgM	variable	—	—
Pig		+++	+++	++++
Rabbit	no distinction	++++	+++	++++
	IgG1	—	+	++

Rat	IgG2a	—	++++	++++
	IgG2b	—	++	++
	IgG3	+	++	++
Sheep		+/-	++	++

++++=结合能力强；++=结合能力中等；—=结合能力弱或没有结合。

免疫沉淀

方式一（SDS Sample buffer洗脱法）

- 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物（体积控制在300-500 uL），加入80%-100%裂解物体积的Incubation buffer，加入1-4 ug特异性抗体，4℃旋转过夜。
- 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
- 将 Protein A Magarose Beads 轻柔颠倒数次，保证磁珠完全混匀，按每个IP取30-50 uL磁珠悬浮液，计算需要使用的磁珠总体积，移液器取计算体积的磁珠悬浮液转移至离心管中，将离心管放置在磁分离器上，静置30 s-1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液。再将离心管磁从分离器上取下来，加入1 mL的PBS，使用枪头轻轻反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液，总共洗涤3次，用PBS重悬至取用磁珠的原体积。
- 加入30-50 uL重悬的 Protein A Magarose beads，4℃ 旋转孵育1-4 h。
- 用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物，磁性分离，弃上清，累计洗涤3次。最后一次洗涤上清尽量去除干净。
- 加入100 uL 1 × Sample Buffer，重悬IP复合物beads，沸水浴加热5 min。
*为了获得更高的IP产物浓度，1x Sample Buffer可以适当减少，不建议低于50 uL。
- 磁性分离吸附磁珠后，小心吸取上清转入新的EP管中。
- 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

方式二（酸洗脱法）

- 用预冷的含蛋白酶抑制剂的RIPA buffer裂解细胞或组织。取1-3 mg总蛋白的裂解物300-500 uL于1.5 mL微量离心管中，加入80%-100%裂解物体积的Incubation buffer，加入1-4 ug特异性抗体，4℃旋转过夜。
- 吸取等量蛋白裂解物，加入等量Incubation buffer并加入同种属等量的IgG孵育作为Control IgG对照组。4℃旋转过夜。
- 将 Protein A Magarose Beads 轻柔颠倒数次，保证磁珠完全混匀，按每个IP取30-50 uL磁珠悬浮液，计算需要使用的磁珠总体积，移液器取计算体积的磁珠悬浮液转移至离心管中，将离心管放置在磁分离器上，静置30 s-1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液。再将离心管磁从分离器上取下来，加入1 mL的PBS，使用枪头轻轻反复吹打 5 次，将离心管置于磁分离器上，大约 1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液，总共洗涤3次，用PBS重悬至取用磁珠的原体积。
- 向纯化柱中加入30-50 uL重悬的 Protein A Magarose beads,4℃旋转孵育1-4 h。
- 将离心管放置在磁分离器上，静置30 s-1 min，待溶液变澄清后，用移液器吸弃清液。
- 用1 × Washing buffer（现加蛋白酶抑制剂）洗涤沉淀复合物，磁性分离，弃上清，累计洗涤3次。最后一次洗涤上清尽量去除干净。
- 向离心管中加入80 uL Elution buffer，使用枪头轻轻反复吹打 5 次，室温静置5-10 min，期间可以轻轻摇晃 2-3次，重悬沉淀复合物，以达到更好的洗脱效果，将离心管放置在磁分离器上，静置30 s-1 min，待溶液变澄清后，用移液器将洗脱产物转移至新的做好标记的离心管中。
- 向有洗脱产物的离心管中加入10 uL 碱中和液以及23 uL 5 x Sample Buffer，沸水浴加热5 min。
*为了获得更高的IP产物浓度，Elution buffer，碱中和液和5 x Sample Buffer可以按比例减少，一般不建议Elution buffer低于50 uL。
- 取20-40 uL样品进行免疫印迹检测，设置Control IgG对照和Input对照。

参考配方：

RIPA裂解液	配制：1000 mL
Tris	6 g
NaCl	8.76 g
脱氧胆酸钠	5 g
SDS	1 g
NaF	0.42 g
EDTA.2Na.2H ₂ O	1.86 g
Triton X-100	10 mL
盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 mL，4℃保存	
注：PMSF及其它蛋白酶抑制剂现用现加	

5X SDS sample buffer	配制：50 mL
Tris HCl(1M母液，pH 7.0)	12.5 mL
甘油	17.5 mL
SDS	7.5 g
溴酚蓝	15 mg

补ddH₂O至37.5 mL，分装并保存在-20°C

现用现加还原剂：25% DTT (2M母液)

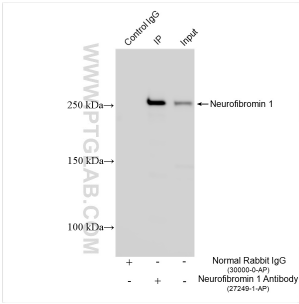
Incubation buffer	配制：1000 mL
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.14 g
NaCl	8 g
NaF	0.42 g
EDTA.2Na.2H ₂ O	1.86 g
1 M NaOH调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 mL，4°C保存	

Washing buffer (1 x TBST)	配制：1000 mL
Tris	2.42 g
NaCl	8.76 g
KCl	0.373 g
Tween-20	2 mL
盐酸调pH至7.4，补ddH ₂ O定容至1000 mL	

洗脱液 (Elution buffer)	配制：500 mL
NaCl	14.6 g
Glycine	5.625 g
调pH至1.5-2.0，补ddH ₂ O定容至500 mL，4°C保存	

碱中和液 (Alkali neutralization buffer)	
NaOH溶液	0.9 M-1.3 M
The final concentration is adjusted addcording to Elution buffer	

Validation Data



IP result of anti-Neurofibromin 1 (IP: 27249-1-AP, 4 ug; Detection: 27249-1-AP 1:1000) with HEK-293 cells lysate 1800 ug.